

بررسی اثر اسانس اندام‌های هوایی گیاه اکلیل کوهی (*Rosmarinus officinalis* L.) بر روی حافظه سالم و تخریب شده با هیوسین بر یادگیری فضایی در موش صحرایی

حسین حسین‌زاده^{۱*}، غلامرضا کریمی^۲، نعیمه نوبخت^۳

۱- استاد، گروه فارماکودینامی و سم‌شناسی، مرکز تحقیقات علوم دارویی و دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم

پزشکی مشهد

۲- دانشیار، گروه فارماکودینامی و سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۳- داروساز

*آدرس مکاتبه: مشهد، دانشکده داروسازی، صندوق پستی: ۹۱۷۷۵-۱۳۶۵

تلفن: ۶-۸۸۳۳۲۵۵ (۰۵۱۱) نمابر: ۸۸۳۳۲۵۱ (۰۵۱۱)

پست الکترونیک: hosseinzadehh@yahoo.com

چکیده

در این تحقیق اثرات تزریق داخل صفاقی اسانس اکلیل کوهی (*Rosmarinus officinalis* L.) بر روی حافظه سالم و حافظه تخریب شده با هیوسین به روش Morris water maze در رت بررسی شد. هر موش به مدت ۵ روز و هر روز یک نوبت (هر نوبت شامل ۴ تجربه) از ۴ ربع حوضچه ماز به طور تصادفی تحت آزمایش قرار می‌گرفت. مواد و عصاره‌ها به جز هیوسین (۲۰ دقیقه) نیم ساعت قبل از شروع آزمایش به صورت داخل صفاقی تزریق شد. در روز پنجم یک سری آزمون‌های حرکتی به روش جعبه باز (Open field) بر روی حیوانات انجام می‌شد.

اکلیل کوهی در محدوده دوزهای ۵۰۰-۱۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم زمان یافتن سکو را در حافظه سالم کاهش داد. اثر اسانس بر روی حافظه تخریب شده توسط هیوسین (۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) نیز بررسی شد. این گیاه با دوز ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث کاهش اثرات تخریبی هیوسین بر روی حافظه شد. اثر اسانس بر روی فعالیت حرکتی رت به روش جعبه باز بررسی گردید. اکلیل کوهی با دوزهای ۲۵۰-۱۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم اثر معنی‌داری بر روی فعالیت حرکتی نداشت ولی با دوز بالا (۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) باعث کاهش فعالیت حرکتی در حیوانات شد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که اسانس اکلیل می‌تواند باعث افزایش توانایی حافظه سالم و تخریب شده می‌گردد. این اثر در آینده نوید بخش معرفی دارویی در کاهش اختلالات حافظه و یادگیری ناشی از زوال مغزی در بیماری‌هایی چون آلزایمر می‌باشد.

گل‌واژگان: اکلیل کوهی، حافظه، یادگیری، Morris water maze



مقدمه

اکلیل کوهی گیاهی است پایا و معطر که به صورت بوته‌ای و دارای ساقه‌های چوبی به ارتفاع ۱-۰/۵ متر به حالت خودرو می‌روید. اسانس سر شاخه‌های این گیاه بویی معطر دارد [۱]. اسانس این گیاه به تناسب محل رویش آن، دارای ترکیبات شیمیایی متفاوتی است. مهمترین ترکیبات آن کامفن، لیمونن، بورنئول، سینئول، لینالول و رینول است. فلاونوئیدهای آن شامل دیزومتین، دیزومین، لوتولین و غیره می‌باشد. همچنین اسانس این گیاه دارای ترکیبات فنلی کافنیک، کلروژنیک، نئوکلروژنیک، لابیاتیک اسید و نیز دارای مقدار زیادی سالیسیلات است. تری‌ترپن‌ویدهای این اسانس گیاه شامل تری‌ترین اولتانولیک اسید و ارسولیک اسید و دی‌ترین آن به نام کارنوسول است [۲]. در طب سنتی از این گیاه به عنوان ضد آسم، هضم‌کننده غذا، سداتیو، برطرف‌کننده سردرد، برطرف‌کننده اختلالات گردش خون، افزایش‌دهنده قدرت بینایی، ضد رماتیسم و محرک حافظه استفاده می‌شود [۳، ۴، ۵].

اثرات فارماکولوژیکی متعددی از جمله اثر آنتی‌اکسیدانتی تحریک فاکتور رشد عصبی، کاهش سندرم محرومیت به مرفین و مهار سمیت کبدی برای این گیاه گزارش شده است [۶، ۷، ۸، ۹]. از آنجایی که در طب سنتی از این گیاه جهت تحریک حافظه استفاده می‌شود، برای مستند کردن این فعالیت، اثر اسانس اندام‌های هوایی گیاه اکلیل کوهی بر روی حافظه فضایی موش صحرایی به روش Morris water maze مورد بررسی قرار گرفت [۵].

روش کار

حیوان

موش‌های صحرایی (rat) نر بالغ از نژاد Wistar با محدوده وزنی ۲۵۰-۳۰۰ گرم از موسسه رازی تهیه شدند و مورد استفاده قرار گرفتند. حیوانات به گروه‌های ۶ تایی تقسیم شدند و در قفس‌های مخصوص با شرایط دوره روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته و دمای 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگهداری گشتند. هیچ‌گونه محدودیت غذا یا آب برای حیوانات وجود نداشت.

اسانس‌گیری

اسانس‌گیری به روش بخار آب با دستگاه اسانس‌گیری به مدت ۲ ساعت صورت گرفت.

آزمون حافظه و یادگیری [۱۰]

جهت ارزیابی اثر مواد بر روی حافظه و یادگیری فضایی روش Morris water maze مورد استفاده قرار گرفت. دستگاه Morris water maze مورد استفاده از یک حوضچه

استوانه‌ای شکل سیاه رنگ با قطر ۱۳۶ و ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر تشکیل شده بود که تا ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر آن با آب 1 ± 20 درجه سانتی‌گراد پر می‌شد. یک سکوی کوچک از جنس فلز تیره رنگ شده با قطر ۱۰ سانتی‌متر، یک سانتی‌متر زیر سطح آب در مرکز ربع دایره جنوب غربی قرار داشت. آزمایش‌ها در اتاق نسبتاً تاریکی انجام می‌گرفت که علایم قابل رؤیتی در چهار طرف آن نصب شده بود و حیوان می‌توانست با استفاده از این علایم موقعیت سکوی پنهان را پیدا کند.

موش به طور تصادفی از یکی از ربع‌های حوضچه آزاد می‌شد و زمان پیدا کردن سکو توسط آزمایشگر ثبت می‌گردید. هر موش به مدت ۵ روز و هر روز یک نوبت (هر نوبت شامل ۴ تجربه) از ۴ ربع حوضچه به طور تصادفی تحت آزمایش قرار می‌گرفت. در هر تجربه حیوان به طوری که صورتش به طرف دیواره استوانه باشد از یکی از چهار نقطه شروع (شمال، جنوب، شرق یا غرب) در آب رها می‌شد. هر یک از چهار نقطه شروع در هر نوبت یک بار استفاده می‌شد. یک تجربه زمانی به اتمام می‌رسید که موش بر روی سکو رفته و یا ۹۰ ثانیه گذشته باشد. سپس ۳۰ ثانیه به حیوان فرصت داده می‌شد و پس از آن، تجربه بعدی شروع می‌گردید.

موش‌هایی که محل سکو را پیدا نمی‌کردند توسط آزمایشگر به روی سکو منتقل شده و اجازه می‌یافتند ۳۰ ثانیه در آنجا بمانند. پس از اتمام تجربه چهارم موش‌ها از حوضچه خارج می‌شدند. مواد و عصاره‌ها به جز هیوسین (۲۰ دقیقه) نیم ساعت قبل از شروع آزمایش به صورت داخل صفاقی تزریق شد [۸، ۱۱]. در روز پنجم یک سری آزمون‌های حرکتی به صورت Open field بر روی حیوانات انجام می‌شد.

تعیین فعالیت حرکتی [۱۲]

آزمون جعبه باز (Open field activity)

پس از تزریق ماده مورد بررسی این تست در اتاقی که شرایط اتاق نگهداری حیوانات را داشت در محفظه‌ای چوبی به طول‌های 100×100 سانتی‌متر و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر که با رنگ سفید پوشیده شده بود انجام شد. داخل محفظه چوبی با خط‌های قرمز رنگ به ۲۵ خانه تقسیم شده بود که هر خانه 20×20 سانتی‌متری بود. حیوانات در زمان مقرر در خانه مرکزی قرار داده می‌شدند و اعمال آنها به مدت ۵ دقیقه مورد بررسی قرار می‌گرفت. اعمال مورد بررسی شامل: تعداد ایستادن حیوان با تکیه به دیوار، ایستادن روی دوپا، لیسیدن دست و پا، فضله و تعداد دفعاتی که حیوان در ۹ خانه مرکزی و ۱۶ خانه محیطی قرار می‌گرفت بود. تعداد دفعاتی که حیوان در کل خانه‌های جدول قرار می‌گرفت نیز شمارش می‌شد.



II- حافظه تخریب شده با هیوسین

الف- هیوسین:

هیوسین (۰/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) باعث افزایش زمان یافتن سکو در تمامی روزها شد (شکل شماره ۲).

ب- اسانس و هیوسین:

اسانس با دوز ۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم در تمامی روزها به طور معنی داری اثرات هیوسین را مهار کرد (شکل شماره ۲).

آزمون جعبه باز (Open field activity)

الف- اسانس:

اسانس اکلیل کوهی با دوزهای ۱۲۵-۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم در مجموع اثر معنی داری بر روی عوامل مورد بررسی آزمون جعبه باز نداشت ولی دوز بالا اسانس (۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) باعث کاهش عوامل حرکتی و همچنین دست زدن به دیوار و بلند کردن دست شد (شکل های ۳، ۴ و ۵).

ب- هیوسین:

هیوسین به طور بارزی تمامی فاکتورهای این آزمون را (به جز عامل grooming و حرکت مرکزی) کاهش داد (شکل های ۷-۳).

ه- اسانس و هیوسین:

مصرف توام اسانس با هیوسین باعث افزایش فاکتورهای حرکتی در اکثر موارد نسبت به گروه هیوسین شد (شکل های ۷-۳).

متغیرهای مورد بررسی:

Locomotion: که به سه قسمت مرکزی Central، Periphral و Total تقسیم شد. که مجموعه حرکت در قسمت مرکزی (خانه های دور خانه مرکز) و مجموعه حرکت در قسمت محیطی (خانه های پایه دیواره جعبه) شمارش می شد.
Grooming: حیوان خود را می لیسد و تمیز می کند.
Rearing: حیوان بر روی دو پای خود می ایستد.
Leaning: حیوان خود را به دیواره متصل می کند.
Defecation: تعداد فضله های حیوان

آنالیز آماری داده ها

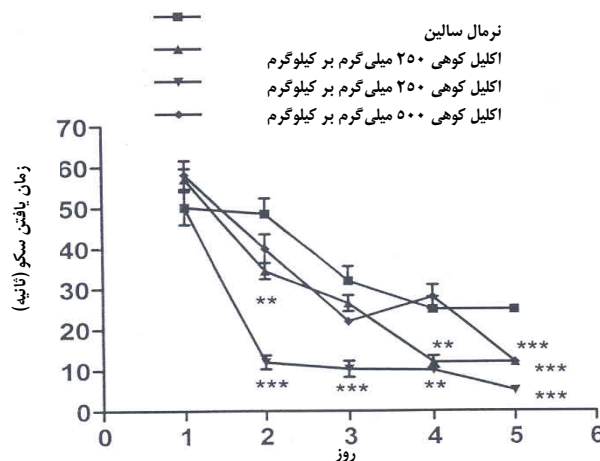
داده ها به صورت میانگین \pm خطای معیار گزارش شده است. پس از انجام ANOVA، و در صورت معنی دار بودن آن از تست Tukey - Kramer استفاده شد. نتایج با $p < 0/05$ به عنوان معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

آزمون ماز آبی موریس

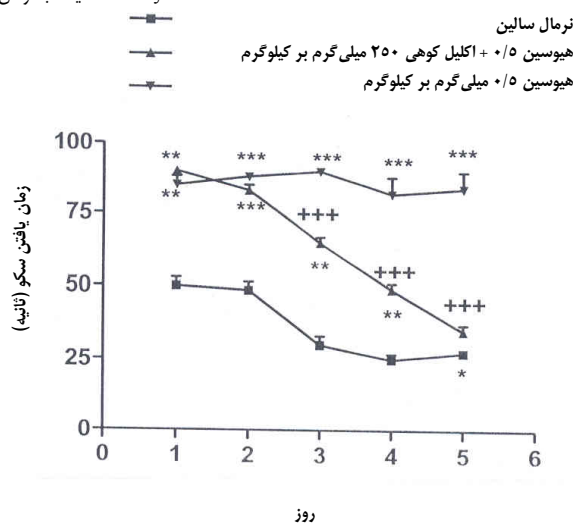
I- حافظه سالم

اسانس اکلیل کوهی با دوز های ۱۲۵-۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم در مجموع باعث کاهش زمان یافتن سکو در تمام روزها شد. این اثر به خصوص با دوز ۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم بارزتر بود. دوز بالا اسانس (۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) فقط در روز پنجم باعث کاهش زمان یافتن هدف شد (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱- بررسی اثر اسانس اندام هوایی اکلیل کوهی بر حافظه و یادگیری سالم موش صحرایی به روش ماز آبی موریس.

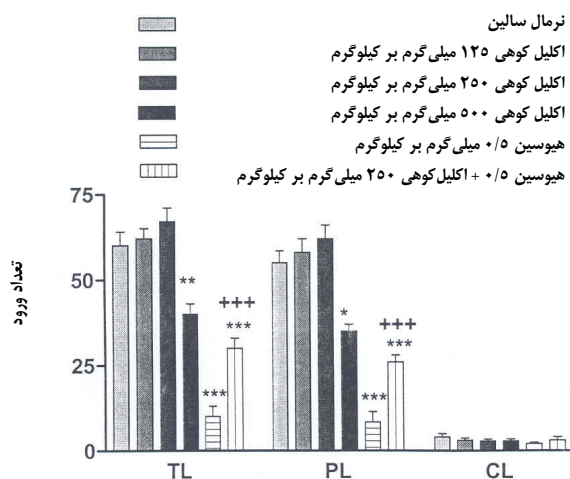
به صورت میانگین زمان یافتن سکو + خطای استاندارد ۶ ماهه، صحاره، نماش، داده شده است. آزمون: Tukey-Kramer، مقایسه با نرمال سالین. $p < 0.001$ ، $p < 0.01$ ، $p < 0.05$ **



شکل شماره ۲- بررسی اثر اسانس اندام هوایی اکلیل کوهی بر حافظه و یادگیری تخریب شده با هیوسین موش صحرایی به روش ماز آبی موریس.

داده‌ها به صورت میانگین زمان یافتن سکو + خطای استاندارد ۶ موش صحرایی نمایش داده شده است. آزمون: Tukey-Kramer، مقایسه با هیوسین (+) و نرمال سالین. $p < 0.001$ ، $p < 0.01$ ، $p < 0.05$ ***

$p < 0.001$ ، $p < 0.01$ ، $p < 0.05$ **



شکل شماره ۳- بررسی اثر اسانس اندام هوایی اکلیل کوهی بر فعالیت حرکتی موش صحرایی در آزمون جعبه باز (Open-field test).

تعداد ورود به خانه‌های مرکزی = CL، تعداد ورود = PL و کل تعداد ورود به خانه‌ها = TL. داده‌ها به صورت میانگین ورود به خانه‌های جعبه باز + خطای استاندارد ۶ موش صحرایی

نمایش داده شده است. آزمون: Tukey-Kramer، مقایسه با هیوسین (+) و نرمال سالین (*). $p < 0.001$ ، $p < 0.01$ ، $p < 0.05$ ***

ایسکمی می‌گردد و در حالت ایسکمی توانایی یادگیری و حافظه و نیز تولید نروترانسmitter استیل کولین کاهش می‌یابد و نیز مشخص شده استفاده از ترکیباتی مانند ارسولیک اسید که باعث

بهبود جریان خون مغزی و رفع حالت ایسکمی می‌گردند، سبب افزایش توانایی حافظه و یادگیری می‌گردند [۱۳]. لذا با توجه به اینکه گیاه اکلیل کوهی می‌تواند جریان خون مغزی را افزایش

بحث

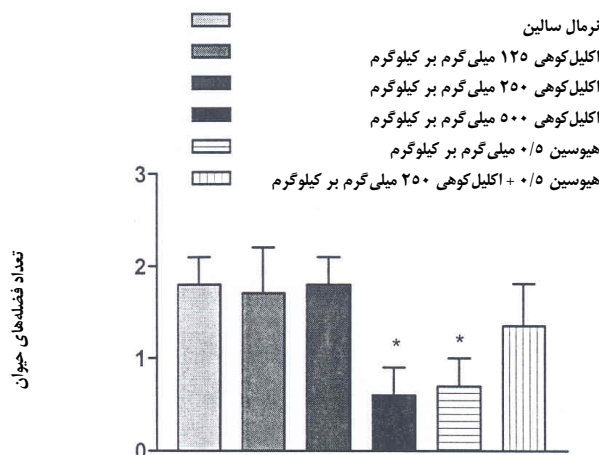
نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که در مجموع اسانس اندام‌های هوایی اکلیل کوهی باعث تقویت حافظه سالم و تخریب شده با هیوسین می‌شود.

مطالعه انجام شده نشان می‌دهد که کاهش جریان خون مغزی منجر به کاهش اکسیژن‌رسانی به بافت‌های مغز و ایجاد

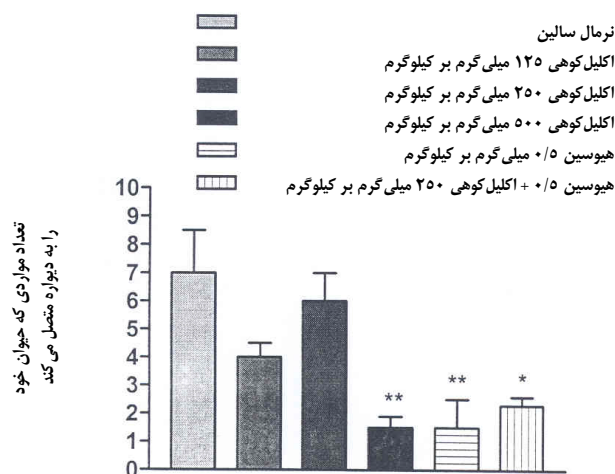


دهد، احتمالاً با این مکانیسم می‌تواند باعث بهبود توانایی حافظه و یادگیری گردد [۱۴].

همچنین از آنجا که سیستم کولینرژیک و به خصوص استیل کولین نقش مهمی در فرایند حافظه و یادگیری ایفا می‌کند (در درمان بیماری فراموشی و زوال مغزها از ترکیباتی که سطح استیل کولین را بالا نگه می‌دارند، استفاده می‌شود) [۱۴،۱۵]. لذا با



شکل شماره ۴- بررسی اثر اسانس اندام هوایی اکلیل کوهی بر روی تعداد فضله دفع شده موش صحرایی در آزمون جعبه باز (Open-field test). داده‌ها به صورت میانگین تعداد فضله دفع شده + خطای استاندارد ۶ موش صحرایی نمایش داده شده است. آزمون Tukey-Kramer، مقایسه با نرمال سالین: $p < 0.05$.*



شکل شماره ۵- بررسی اثر اسانس اندام هوایی اکلیل کوهی بر شاخص دست زدن به دیوار موش صحرایی در آزمون جعبه باز (Open-field test). داده‌ها به صورت میانگین شاخص دست زدن به دیوار + خطای استاندارد ۶ موش صحرایی نمایش داده شده است. آزمون Tukey-Kramer، مقایسه با نرمال سالین: $p < 0.01$ **, $p < 0.05$.*

می‌تواند از طریق افزایش سطح استیل کولین باعث بهبود عملکرد حافظه و یادگیری توسط گیاه اکلیل کوهی گردد [۱۳].

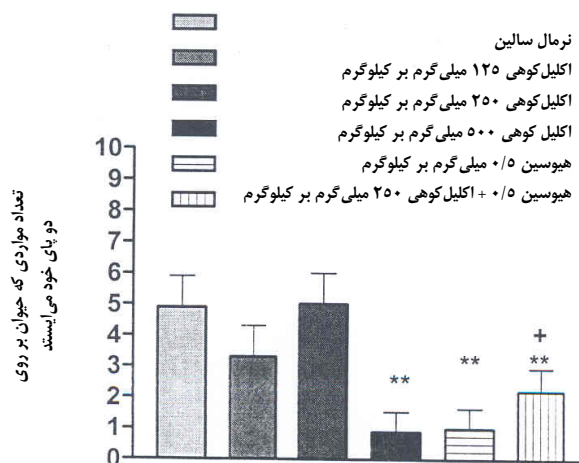
همچنین تحقیقات نشان داد که دی‌ترین کارنوسول که در اسانس این گیاه موجود است، دارای اثر محافظتی بر گیرنده‌های موسکارتینی استیل کولین در مقابل اثر تخریبی رادیکال‌های آزاد می‌باشد و از آنجا که این گیرنده‌ها برای عملکرد فرایند حافظه و یادگیری ضروری هستند، لذا این ترکیب نیز می‌تواند در اثر افزایش اکلیل کوهی بر روی قدرت حافظه و یادگیری دخالت داشته باشد [۱۷].

اسانس اکلیل کوهی در دوزهای پایین بر روی فاکتورهای حرکتی اثر معنی‌داری نداشت. ولی دوز بالا آن یعنی ۵۰۰ میلی‌گرم بر گرم باعث کاهش

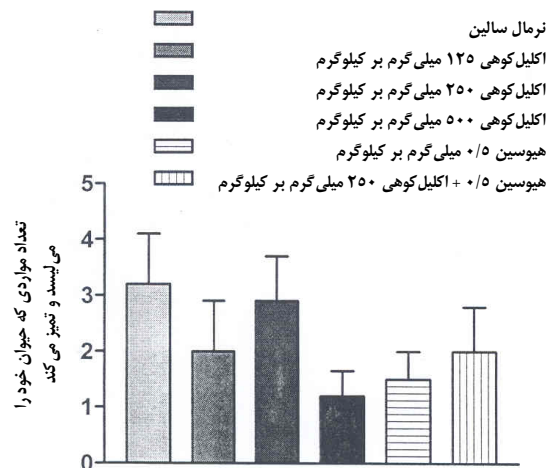
توجه به اینکه گیاه اکلیل کوهی باعث تقویت سیستم کولینرژیک در مغز می‌شود، از طریق این مکانیسم نیز می‌تواند باعث افزایش قدرت حافظه و یادگیری گردد [۱۶].

مطالعات و بررسی‌هایی که در مورد هر یک از اجزا اسانس اکلیل کوهی و ارتباط آنها با مکانیسم‌های مرتبط با حافظه و یادگیری انجام شده نشان می‌دهد ترکیب اورسولیک اسید (۳- هیدروکسی ۱۲ اورسن ۲۸ اوئیک اسید) که علاوه بر اکلیل کوهی از بسیاری از گونه‌های گیاهی دیگر مانند *Origanum majorana* L. جدا شده است، دارای اثرات مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استراز می‌باشد و در درمان آلزایمر نیز به کار می‌رود، لذا این ترکیب

عوامل حرکتی شد. همچنین اسانس با دوز ۲۵۰ میلی گرم بر گرم اثر مهار هیوسین بر روی حرکت را کاهش داد به



شکل شماره ۶- بررسی اثر اسانس اندام هوایی اکلیل کوهی بر شاخص بلند کردن دست موش صحرایی در آزمون جعبه باز (Open-field test). داده‌ها به صورت میانگین شاخص بلند کردن دست + خطای استاندارد ۶ موش صحرایی نمایش داده شده است. آزمون Tukey-Kramer، مقایسه با هیوسین (+) و نرمال سالین (۰) $p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.001$.



شکل شماره ۷- بررسی اثر اسانس اندام هوایی اکلیل کوهی بر شاخص لیسیدن دست و پا و حرکات مشابه موش صحرایی در آزمون جعبه باز (Open-field test). داده‌ها به صورت میانگین شاخص لیسیدن دست و پا و حرکات مشابه + خطای استاندارد ۶ موش صحرایی نمایش داده شده است.

نتایج این تحقیق نشان داد که اثر گیاه اکلیل کوهی در افزایش توانایی حافظه و یادگیری، یک اثر وابسته به دوز است و این اثر در دوز ۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم در بالاترین میزان خود می باشد. همچنین نتایج آزمون حرکت نشان داد که کاهش میزان حرکت در دوز ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم می تواند دلیل احتمالی سیر نزولی منحنی دوز- پاسخ در دوز مذکور باشد.

باعث کاهش اثر بر روی حافظه می شود [۳]. داروهای آرامبخش همچنین باعث کاهش grooming و دفع فضله می شوند [۱۷]. در این تحقیق نیز اکلیل کوهی با دوز بالا این دو عامل را کاهش داد. اگرچه اثر آن بر روی grooming معنی دار نبود. کاهش اثر هیوسین روی عوامل حرکتی توسط اسانس اکلیل کوهی در دوز ۲۵۰ میلی گرم بر گرم احتمالاً قسمتی مرتبط با مهار اثر آنتی کولینرژیکی هیوسین می باشد.

- baclofen-an scopolamine-induced deficit in Morris water maze task in rats. *Brain. Res.* 1997; 766: 101-106.
11. Corina Bejar, Rui-Hua Wang, Marta Weinstock Effect of rivastigmine on scopolamine-induced memory impairment in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 1999; 383: 231-240.
 12. Pardon MC, Perez-Diaz F, Joubert C, Cohen-Salmon C. Age- dependent effects of a chronic ultramild stress procedure on open-field behaviour in B6D2F1 female mice. *Physiol. Behav.* 2000; 70: 7-13.
 13. Chung YK, Heo HJ, Kim EK, Kim HK, Huh TL, Lim Y, Kim SK. Inhibitory effect of ursolic acid purified from *Organium majoranal* on the acetylcholinesterase. *Mol. Cells.* 2001; 11: 137-143.
 14. Anonymous. *Quick Access Professional Guide to Conditions, Herbs and Supplements.* First ed. Newton: Integrative medicine communications. 2000, p: 78.
 15. Buccafusco JJ, Terry AV. Multiple central nervous system targets for eliciting beneficial effects on memory and cognition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000; 295: 438-446.
 16. Perry EK. Medicinal plants and Alzheimer's disease: intergrating ethnobotanical and contemporary scientific evidence. *J. Altern. complement Med.* 1998; 4, 419-427.
 17. Fawcett JR, Bordago EZ, Jackson K, Liu, H, Peterson J, Suitak A, Frey WH. Inactivation of the human brain muscarinic acetylcholine receptor by oxidative damage. Catalyzed by a low molecular weight endogenous inhibitor from Alzheimer's brain is prevented by pyrophosphate analogos, bioflavonoids and other antioxidant. *Brain. Res.* 2002; 950, 10-20.
 1. زرگری علی. گیاهان دارویی. چاپ چهارم. انتشارات دانشگاه تهران. ۱۳۶۹، جلد چهارم، صفحات ۷۶-۷۱.
 2. Dermarderosian A. *The Review of Natural Products.* First ed. Missouri: Wolters Kluwer Co. 2001, pp: 512-13.
 3. De Feo V, Senatore F. Medicinal plants and phytotherapy in the Amalfitan coast, Salerno province, Campania, Southern Italy. *J Ethnopharmacol.* 1993; 39: 39-51.
 4. Martinez-Lirola MJ, Gonzalez-Tejero MR, Molero-Mesa J. Ethanobotanical resources in the province of Almeria, Spain: Campos De Nijar. *Econ. Bot.* 1996; 50: 40-56.
 5. Chandler F. Memory stimulat: herbal medicine. *Can. Pharm. J.* 1995; 28: 40-53.
 6. Ozcan M. Antioxidant activities of rosemary, sage, and sumac extracts and their combinations on stability of natural peanut oil. *J. Med. Food.* 2003; 6:267-70.
 7. Kosaka K, Yokoi T. Carnosic acid, a component of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), promotes synthesis of nerve growth factor in T98G human glioblastoma cells. *Biol. Pharm. Bull.* 2003; 26:1620-2.
 8. Hosseinzadeh H, Nourbakhsh M. Effect of *Rosmarinus officinalis* L. aerial parts extract on morphine withdrawal syndrome in mice. *Phytother. Res.* 2003; 17:938-41.
 9. Sotelo-Felix JI, Martinez-Fong D, Muriel P, Santillan RL, Castillo D, Yahuaca P. Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. *J. Ethnopharmacol.* 2002; 81:145-54.
 10. Nakagawa Y, Takashima T. The GABAB receptor antagonist CGP36742 attenuates the